



Pct/E 13/03604

Mod. 9 EJ 1-4599

WIPO

PCT

# MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

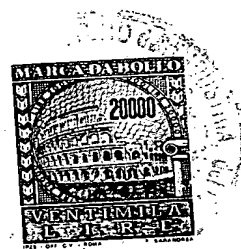
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

EP99/3604

INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. PD98 A 000299



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

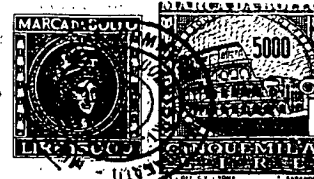
PRIORITY DOCUMENT

17 MAG. 1999

ma, li .....

IL REGGENTE  
IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE  
D.ssa Paola DI CINTIO

*Paola Di Cintio*



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.r.l.**  
Residenza **BRINDISI** codice **00510440744**  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome \_\_\_\_\_ cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza \_\_\_\_\_  
via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario **FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.r.l.**

via **Ponte della Fabbrica** n. **3/A** città **Abano Terme** cap **35031** (prov) **PD**

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) \_\_\_\_\_

gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

**"Biomateriali comprendenti derivati dell'acido ialuronico in forma di  
struttura tridimensionale per la rigenerazione dei tessuti"**

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_

N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **PAVESIO Alessandra** 3) **CALLEGARO Lanfranco**  
2) **DONA' Massimo** 4) \_\_\_\_\_

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

**nessuna**

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** **PROV.** n. pag. **33** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
Doc. 2) **0** **PROV.** n. tav. \_\_\_\_\_ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
Doc. 3) **0** **RIS** lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale \_\_\_\_\_  
Doc. 4) **0** **RIS** designazione inventore \_\_\_\_\_  
Doc. 5) **0** **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano \_\_\_\_\_  
Doc. 6) **0** **RIS** autorizzazione o atto di cessione \_\_\_\_\_  
Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente \_\_\_\_\_

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale lire **cinquecentosessantacinquemila---**

**FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.r.l.**

obbligatorio

COMPILATO IL **18.12.1998** FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

**IL PRESIDENTE**

**Dott. Luciano Tolusso**

CONTINUA S/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

**PADOVA**

codice **28**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**PD 98 A 000299**

Reg. A

L'anno millenovecento

**NOVANTOTTO**

il giorno

**VENTUNO**

del mese di

**DICEMBRE**

il (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. \_\_\_\_\_ fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

**NESSUNA**

IL DEPOSITANTE

**Daniela Franco**



L'UFFICIALE ROGANTE

**bio Zoffe**

RIASSUNTO INVENZIONE C N DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA PD 98 A 299

REG. A

DATA DI DEPOSITO 21/12/1998

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

## D. TITOLO

"Biomateriali comprendenti derivati dell'acido ialuronico in forma di struttura tridimensionale per la rigenerazione dei tessuti"

## L. RIASSUNTO

Biomateriali biocompatibili e biodegradabili comprendenti derivati dell'acido ialuronico, aventi struttura tridimensionale contenente spazi vuoti creati da pori comunicanti e/o fibre fini o microfibre intrecciate tra loro da usare per la rigenerazione dei tessuti.

## M. DISEGNO



Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo  
"Biomateriali comprendenti derivati dell'acido ialuronico in forma di struttura  
tridimensionale per la rigenerazione dei tessuti", della Fidia Advanced  
Biopolymers S.r.l. con sede in Via De' Carpentieri 3, 72100 - Brindisi, Italia,  
nella persona del suo Presidente e Legale Rappresentante, Dott. Luciano  
Tolusso.

Inventori: Alessandra PAVESIO

Massimo DONA'

Lanfranco CALLEGARO

Depositata il 21-12-98 con N. PD 98 A 0 0 0 2 9 9

\*\*\*\* \*

#### OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a biomateriali biocompatibili e  
biodegradabili comprendenti derivati dell'acido ialuronico, aventi struttura  
tridimensionale contenente spazi vuoti creati da pori comunicanti e/o fibre fini  
o microfibre intrecciate tra loro da usare per la rigenerazione dei tessuti.

#### CAMPO DELL'INVENZIONE

L'acido ialuronico è un etero polisaccaride composto da residui alternati di  
acido D-glucuronico e N-acetil-D-glicosammina. E' un polimero a catena  
lineare con peso molecolare che può variare tra 50.000 e 13.000.0000 Da a  
seconda della fonte dalla quale viene ottenuto e dai metodi di preparazione e di  
determinazione impiegati. E' presente in natura nei gel pericellulari, nella  
sostanza fondamentale del tessuto connettivo degli organismi vertebrati dei



quali rappresenta uno dei componenti principali, nel fluido sinoviale delle giunture, nell'umor vitreo, nei tessuti del cordone ombelicale umano e nelle creste di gallo.

L'acido ialuronico esplica un ruolo vitale in molti processi biologici come, ad esempio, l'idratazione dei tessuti, l'organizzazione dei proteoglicani, la differenziazione cellulare, la proliferazione e l'angiogenesi (J. Aigner et al., L. Biomed. Mater Res, 1998, 42, 172-181).

E' noto che frazioni di acido ialuronico possono essere utilizzate per facilitare la riparazione dei tessuti, come sostituenti del liquido endobulbare, o somministrate per via intra-articolare nella terapia delle patologie delle giunzioni, come descritto nei brevetti europei No. 0138572 e No. 0535200.

L'acido ialuronico ha un ruolo fondamentale nel processo di riparazione dei tessuti, soprattutto nei primi stadi della granulazione, stabilizzando la matrice di coagulazione e controllando la sua degradazione, favorendo il reclutamento di cellule infiammatorie come, ad esempio, leucociti polimorfonucleati e monociti, di cellule mesenchimali come, ad esempio, fibroblasti e cellule endoteliali ed, infine, orientando la successiva migrazione delle cellule epiteliali.

E' noto che l'applicazione di soluzioni di acido ialuronico può accelerare la guarigione di pazienti affetti da piaghe, ferite ed ustioni. Il ruolo dell'acido ialuronico nelle varie fasi del processo riparativo dei tessuti è stato descritto, attraverso la costruzione di un modello teorico, da Weigel P. H. et al.: "A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the



inflammatory response and wound healing", *J. Theor. Biol.*, 119: 219, 1986.

E' noto altresì l'utilizzo di frazioni di acido ialuronico a basso peso molecolare per la preparazione di composizioni farmaceutiche aventi proprietà osteoinduttiva (US N. 5,646,129).

I derivati dell'acido ialuronico mantengono tutte le proprietà del suddetto glicosamminoglicano con il vantaggio di poter essere processati in forme diverse e di poter variare la loro solubilità e i tempi di degradazione in base al tipo e alla percentuale di derivatizzazione (EP 0216453B1).

Inoltre, i derivati dell'acido ialuronico possono vantare anche nuove proprietà dovute all'inserimento di specifiche molecole nella struttura dell'acido ialuronico. Ad esempio, i derivati solfatati dell'acido ialuronico mostrano proprietà anticoagulanti e sono resistenti alla ialuronidasi (WO 95/25751).

Sono noti gli esteri totali o parziali dell'acido ialuronico e i derivati autoreticolati dell'acido ialuronico, il loro uso in campo farmaceutico, cosmetico e nelle aree dei materiali biodegradabili (brevetti US N. 4,851,521; 4,965,353; 5,676,964).

La domanda di brevetto N. WO 93/20858 descrive soluzioni leganti e paste contenenti acido ialuronico e/o derivati esterei dell'acido ialuronico da utilizzare come riempimento osseo in chirurgia.

Infine, gli esteri dell'acido ialuronico sono stati processati in forma di non-tessuto secondo il processo descritto nel brevetto americano N. 5,520,916.

La presente invenzione fornisce derivati dell'acido ialuronico per la rigenerazione dei tessuti processati in forma di strutture tridimensionali



contenenti spazi vuoti comunicanti creati da pori e/o fibre fini (2,4-1,0 dtex) o microfibre (1,0-0,3 dtex) intrecciate tra loro.

E' stato sorprendentemente trovato che i biomateriali secondo la presente invenzione provocano una rigenerazione tissutale che porta ad un neo tessuto avente struttura e funzionalità proprie del tessuto normale e ben integrato con i tessuti adiacenti anche in assenza di cellule coltivate nei materiali stessi.

Infatti, i suddetti biomateriali mostrano, sorprendentemente, la capacità di creare un ambiente extracellulare simile a quello embrionale che si riscontra nel feto dei mammiferi e che stimola la rigenerazione dei tessuti.

Man mano che i derivati dell'acido ialuronico si degradano rilasciando oligomeri, stimolano il reclutamento delle cellule progenitrici e ne favoriscono lo sviluppo verso la linea delle cellule di cui è composto il tessuto nel quale vengono impiantati i biomateriali.

La struttura dei biomateriali contenente spazi vuoti creati da pori comunicanti e/o da fibre fini o microfibre intrecciate tra loro facilita la penetrazione delle cellule dell'ospite nel biomateriale, la loro adesione al supporto.

Inoltre, la suddetta struttura possiede proprietà di riassorbimento che si adattano alla dinamica dei processi rigenerativi.

Risultati sorprendenti sono stati ottenuti con i derivati parzialmente esterificati (< 85%), in particolare quelli aventi percentuali di esterificazione tra 40 e 85%, preferibilmente tra il 60 e il 85%, e ancora più preferibilmente con i derivati benzilici aventi i suddetti intervalli di esterificazione.

I suddetti esteri in forma di struttura tridimensionale contenente spazi vuoti



comunicanti creati da pori e/o fibre fini o microfibre agglugliate tra loro (US 5,520,916, US 4,851,521), mostrano una sorprendente capacità di stimolare la rigenerazione dei tessuti maggiore rispetto a quella che si ottiene con esteri aventi percentuale di esterificazione maggiore dell'85% e lavorati nella stessa forma.

I derivati autoreticolati in forma di struttura tridimensionale contenente spazi vuoti comunicanti creati da pori e/o fibre fini o microfibre risultano particolarmente adatti per la rigenerazione osteocondrale in quanto mostrano tutte le suddette proprietà (US 5,676,954).

Nel caso in cui gli spazi vuoti della struttura siano rappresentati da pori intercomunicanti, la dimensione di questi ultimi varierebbe da 10 a 700  $\mu\text{m}$  con una porità maggiore dell'80 %

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è fornire biomateriali biocompatibili e biodegradabili comprendenti derivati dell'acido ialuronico processati in forma di strutture tridimensionali contenenti spazi vuoti creati da pori interconnessi e/o fibre fini o microfibre intrecciate tra loro aventi proprietà rigenerativa dei tessuti quali, ad esempio, quelli dermici, ossei, cartilaginei, nervosi, cardiovascolari, adiposi ed epatici.

Tra i derivati dell'acido ialuronico sono da preferire i seguenti:

- gli esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica (EP 0216453 B1);





- Tra i polimeri naturali si possono usare, ad esempio, collagene, coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali la chitina, il chitosano, la pectina o l'acido pectico, l'agar, l'agarosio, lo



xantano, il gellano, l'acido alginico o gli alginati, polimannani o poliglicani, amido, gomme naturali. I polimeri semisintetici, ad esempio, possono essere scelti dal gruppo consistente in collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, dei glicosamminoglicani. Infine, tra i polimeri sintetici possono essere usati, ad esempio, l'acido polilattico, acido poliglicolico o copolimeri degli stessi o dei loro derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani, PTFE.

I biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la presente invenzione possono contenere sostanze farmaceuticamente o biologicamente attive quali, ad esempio, antiinfiammatori, antibiotici, fattori di crescita.

Le suddette strutture tridimensionali comprendono le forme di tessuto non-tessuto, corde, composizioni liofile.

I biomateriali secondo la presente invenzione possono essere vantaggiosamente impiegate in chirurgia umana e veterinaria ed, in particolare, in chirurgia plastica ed estetica, in ortopedia, in odontoiatria, nella chirurgia nervosa, nella chirurgia cardiovascolare, per la rigenerazione dei tessuti dermici, ossei, cartilaginei, nervosi, cardiovascolari, adiposi, epatici ed in generale come riempimento di tessuti soffici in caso di perdita di sostanza.



### Esempio 1

*Valutazione della percentuale di rigenerazione ossea, in un modello di ratto, indotta da acido ialuronico in polvere e da esteri benzilici dell'acido ialuronico con percentuali diverse di esterificazione in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto*

Scopo dell'esperimento è quello di comparare la capacità di indurre la rigenerazione ossea da parte dei derivati esterei dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione diverse e processati in forma di fibre fine a loro volta lavorate in forma di non-tessuto.

Sono stati utilizzati 15 ratti maschi Lister di Liverpool bianchi e neri con peso compreso tra 300 e 350 g. Gli animali sono stati anestetizzati con Immobolina (C-Vet Ltd, Bury St Edmunds, UK) alla dose di 0,1 ml per 100 g di peso corporeo. Dopo aver rasato l'area dell'operazione chirurgica e deterso la pelle, l'osso femorale è stato esposto usando il metodo di taglio e scollamento.

Le ossa di entrambe le zampe sono state forate, sotto abbondante irrigazione di soluzione fisiologica, utilizzando un trapano adattato con una opportuna lama tale da ottenere un foro con un diametro di 1,76 mm.

E' stato usato un elevatore periosteale al di sotto dell'osso come supporto e per proteggere il muscolo sottostante.

Dopo aver inserito gli impianti nella lesione a livello con la superficie dell'osso, il periostio e il tessuto molle sono stati posti di nuovo sulla superficie della ferita e suturati.

La ferita esterna è stata, inoltre, sigillata con un rivestimento di spray acrilico



(Nobecutane®, Astra Pharmaceutica, Kings Langley, UK) per ridurre il rischio di infezione. Gli animali sono stati risvegliati con Revivon® (Reckitt & Coleman) alla dose di 0,05 ml per 100 g di peso corporeo.

Gli animali sono stati trattati come riportato nel seguente schema:

gruppi	No. animali	trattamento
1	3	HA (polvere)
2	3	HYAFF 11 (non-tessuto)
3	3	HYAFF 11p80 (non-tessuto)
4	3	HYAFF 11p65 (non-tessuto)
5	3	controllo

- HA: acido ialuronico frazione hyalastine® e hyalactin® (EP0138572)
- HYAFF 11 (non-tessuto): estere benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione dell'100% in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto (US5,520,916);
- HYAFF 11p65 (non-tessuto): estere benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione del 65% in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto (US5,520,916);
- HYAFF 11p80 (non tessuto): estere benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione dell'80% in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto (US5,520,916);

Dopo 4 settimane gli animali sono stati sacrificati con metodo standard. I femori sono stati prelevati e tagliati in modo da separare la parte trattata. Il midollo osseo è stato allontanato mediante delicate iniezioni con metanolo al 40%, facendo attenzione a non danneggiare la parte con l'impianto.

I campioni sono stati fissati e decalcificati con una soluzione di Lillie per un minimo di 3 giorni, lavati per circa 2 giorni in alcool al 75%, disidratati con lavaggi di alcool a percentuali crescenti ed, infine, inclusi in paraffina. I campioni sono stati successivamente sezionati perpendicolarmente alla



superficie dell'osso e parallelamente al diametro del difetto ottenendo sezioni con uno spessore di 7 microns.

Le 4 sezioni più centrali di ogni campione sono state colorate utilizzando le colorazioni di ematossilina-eosina ed una tricromica di Mallory.

La valutazione istomorfometrica è stata eseguita utilizzando un microscopio analizzatore di immagine (IBAS).

La percentuale di rigenerazione ossea dopo 24 giorni viene mostrata nel grafico 1. Come risulta evidente dal grafico, l'estere benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione del 65% in forma di fibre fine lavorate in forma di non tessuto induce, sorprendentemente, una rigenerazione ossea più elevata rispetto a quelle indotte dall'estere benzilico totale nella stessa forma e dall'acido ialuronico in polvere.

## Esempio 2

*Valutazione della percentuale di riepitelizzazione in un modello di maiale utilizzando esteri benzilici dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione 65 e 100% in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto*

Scopo dell'esperimento è quello di testare in vivo la capacità di indurre la riepitelizzazione da parte di due esteri benzilici dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione rispettivamente 65% e 100% in un modello di ferita indotta sul maiale.

Sono stati utilizzati 6 Micropig YUCATAN maschi di circa un anno di età e aventi un peso di circa 25-30 Kg.



In ogni fase dell'esperimento gli animali sono stati anestetizzati per iniezione intramuscolare con 8ml di una soluzione contenente Xilazina® (20 mg/ml) e Ketamina® (50 mg/ml) in rapporto 1:2. L'anestesia è stata mantenuta, se necessario, mediante iniezioni intravenose di 5-10 mg/Kg di una soluzione di pentobarbital ad una concentrazione di 60 mg/ml. Ad ogni animale, dopo aver indotto l'anestesia, è stato rasato il pelo.

La parte rasata è stata prima lavata con un detergente chirurgico e successivamente disinfettata con una soluzione di iodio. Sono state fatte 6 ferite (3 per fianco) di forma circolare con un diametro di 4 cm rimuovendo completamente sia il tessuto dermico sia quello epidermico e lasciando intatta la sottostante fascia muscolare.

Una camera di PTFE è stata poi posta sul letto della ferita usando i bordi della pelle per fissare la base della camera a livello sottocutaneo. La camera è stata fermata con filo da sutura 2/0 in seta alla pelle circostante.

Gli esteri benzilici dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione 65% e 100% in forma di fibre fini ulteriormente processati in forma di non-tessuto, sono stati applicati sulle ferite secondo il seguente schema:

gruppi	No. di siti testati	trattamento	dose	via di somministrazione
1	12	HYAFF 11p65 (non-tessuto) **	5x5 cm	topica
2	12	HYAFF 11 (non-tessuto) **	5x5 cm	topica
3	12	---	---	---

- *HYAFF11p65 (non-tessuto)*: estere benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione del 65% in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto (US5,520,916);



- *HYAFF11 (non-tessuto)*: estere benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione del 100% in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto (US\$5,520,916);
- \*\*: applicazioni effettuate nel giorno dell'operazione chirurgica e nei seguenti giorni: 7, 14, 21, 28

Dopo il trattamento le ferite sono state coperte con garza vaselinata e gli animali sono stati avvolti con una benda elastica. Per proteggere le ferite è stata usata una giacca rigida leggera legata intorno al tronco dell'animale.

La percentuale di riepitelizzazione è stata calcolata usando un computer analizzatore di immagine (IBAS).

Il grafico 2 mostra la percentuale di riepitelizzazione per ogni trattamento.

Come si può notare dal grafico 2, le ferite trattate con lo HYAFF11p65 in forma di fibre fine lavorate in forma di non-tessuto mostrano risultati di riepitelizzazione sorprendentemente alti rispetto a quelle trattate con l'estere totale processato nella stessa forma.

Poiché le cellule del tessuto epiteliale non potevano provenire né dai follicoli piliferi, poiché la ferita era stata fatta a tutto spessore, né dai margini della ferita poiché erano stati separati dal sito di trattamento mediante la camera di PTFE, l'epitelio formatosi in presenza dei materiali testati avrebbe origine dalle cellule progenitrici richiamate dal biomateriale e provenienti da letto del difetto.

### Esempio 3

*Biomateriali in forma di strutture tridimensionali contenenti spazi vuoti formati da pori comunicanti costituiti da derivati autoreticolati dell'acido ialuronico (ACP) e da esteri benzilici dell'acido ialuronico aventi percentuale*



*di esterificazione superiore all'85% (HYAFF11) nel trattamento di difetti osteocondrali nel coniglio*

La componente chiave nella riparazione delle fratture è la disponibilità di cellule progenitrici dell'osso. Generalmente, tali cellule giungono al sito della lesione attraverso la rivascolarizzazione del sito stesso o attraverso la migrazione delle cellule progenitrici dal periosteo e/o dal midollo osseo verso il blastema di riparazione. Tuttavia, la cartilagine non è un tessuto vascolarizzato o di facile accesso per grosse quantità di cellule progenitrici, per cui spesso la riparazione di tale tessuto non ha successo.

Le cellule progenitrici dei condrociti devono possedere potenzialità di sviluppo, devono essere in grado di rispondere ai segnali locali, devono essere presenti in numero sufficiente, nella densità giusta e con distribuzione appropriata. Le cellule progenitrici mesenchimali (MPCs) devono essere capaci di espandersi in vivo mitoticamente e di differenziarsi nel fenotipo della cartilagine. Infine, la risposta biologica dell'ospite deve supportare il meccanismo acuto di riparazione naturale che richiede l'inibizione della risposta naturale infiammatoria acuta e l'inibizione della rivascolarizzazione.

L'ambiente meccanico deve essere tale da favorire i segnali di sviluppo e il tessuto rigenerante. Questa interazione tra il sito ospite e le cellule progenitrici della cartilagine che migrano nello stesso richiede un ambiente che supporti la ricapitolazione degli eventi embrionali e l'espansione e la differenziazione delle cellule progenitrici dei condrociti in cartilagine ialina tipica dell'adulto.

Oltre alle cellule progenitrici mesenchimali, il sito ospite deve soddisfare il





fabbisogno di molecole che fungono da segnale come, ad esempio, il transforming growth factor  $\beta$  1 che supporta sia la migrazione delle cellule sia la loro espansione mitotica e la differenziazione finale in cellule di cartilagine adulta.

Per le suddette ragioni la cartilagine articolare nell'adulto ha una scarsa capacità di ripararsi da sola. I metodi utilizzati fino ad oggi allo scopo di potenziare la risposta naturale di riparazione permettono la rigenerazione di cartilagine ialina-simile ma successivamente si verifica la formazione di quantità variabili di fibrocartilagine che rappresenta un tessuto riparativo non funzionale.

E' stato sorprendentemente trovato che l'uso dei derivati dell'acido ialuronico facilita la risposta naturale di cicatrizzazione creando un ambiente molto simile a quello embrionale dove le cellule progenitrici endogene possono rigenerare il tessuto lesa.

Lo scopo di questo studio è di sperimentare i derivati dell'acido ialuronico come materiali da impiantare per il trattamento di difetti osteocondrali nel coniglio.

Sono stati effettuati dei difetti standard sulla superficie del condilo femorale nella parte dell'osso che supporta il carico. I difetti sono stati divisi in quattro gruppi di cui uno non trattato e gli altri trattati rispettivamente con biomateriale di ACP, di HYAFF11 e di ACP caricato con stroma di midollo osseo autologo fresco. I conigli sono stati sacrificati a 4 e a 12 settimane dopo la chirurgia e i condili sono stati sottoposti ad analisi istologica. Le caratteristiche del





Il punteggio istologico ha rilevato che i difetti trattati con ACP presentavano una riparazione migliore sia rispetto a quelli trattati con HYAFF11 ( $p < 0,05$ ) sia a quelli non trattati ( $p < 0,002$ ). Non sono state rilevate differenze significative tra i difetti trattati con HYAFF11 e quelli non trattati ( $p = 0,29$ ). Analogamente, nessuna differenza significativa è stata osservata tra i difetti trattati con ACP e quelli con ACP caricato con stroma di midollo osseo a 4 ( $p = 0,15$ ) e 12 settimane ( $p = 0,06$ ).

E' stato eseguito uno studio pilota preliminare utilizzando 4 conigli che sono stati sottoposti a chirurgia del ginocchio. Sono stati effettuati difetti osteocondrali standard di 3 mm di diametro e 3 mm di profondità sulla superficie del condilo femorale che supporta il carico. I difetti sono stati riempiti con il materiale da testare. I conigli sono stati sacrificati una settimana dopo la chirurgia e i difetti sono stati analizzati istologicamente per assicurarsi della presenza dei materiali nei difetti.

Sono stati usati 36 conigli maschi bianchi del ceppo New Zealand di 4 mesi e del peso di 2,5 Kg. Ogni coniglio è stato numerato. Sono stati effettuati difetti sulla superficie del condilo femorale come descritto sopra e sono stati trattati secondo il seguente schema:

Trattamento	4 settimane	12 settimane
Non trattati	12	12
ACP	12	12
HYAFF11	6	6
ACP + stroma di midollo osseo	6	6



I difetti sono stati valutati istologicamente sulla base della scala di O'Driscoll modificata. I punteggi dei difetti sia trattati sia non trattati sono stati comparati con il test Mann-Whitney della somma dei ranghi. I punteggi ottenuti per i difetti trattati con ACP e ACP + stroma di midollo osseo sono stati comparati con il test dei ranghi segnati di Wilcoxon. Inoltre, la presenza di materiale residuo è stata valutata a due tempi di sacrificio stabiliti per valutare il riassorbimento del materiale testato nel modello in vivo.

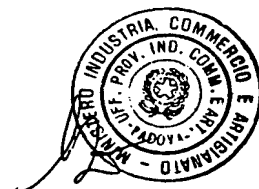
Lo stroma di midollo osseo con il quale è stato caricato l'ACP è stato ottenuto dalla tibia dei conigli mediante la procedura descritta di seguito.

#### **Procedura sperimentale**

##### *Carico dei biomateriali ACP con stroma di midollo osseo*

Sotto anestesia, la superficie mediale prossimale della tibia dei conigli è stata esposta mediante una piccola incisione. Il tessuto subcutaneo e il periosteo sono stati incisi e ripiegati per esporre la superficie dell'osso. La tibia è stata perforata con un ago da 16 G, e lo stroma di midollo osseo (4-5 ml) è stato aspirato dalla tibia mediante un tubo di plastica pre-eparinizzato collegato ad una siringa da 10 ml contenente 1 ml di soluzione di eparina (3.000 unità/ml).

I materiali sono stati tagliati in piccoli cubi con lato di 3 mm e sono stati rivestiti per immersione in una soluzione di fibronectina 100  $\mu$ g/ml in soluzione salina di Tyrode. Dopo un'ora di incubazione a 4°C, i materiali sono stati rimossi dalla soluzione e lasciati asciugare per una notte a temperatura ambiente.



Lo stroma di midollo osseo fresco autologo è stato incorporato nella spugna di ACP in una provetta da 5 ml. La provetta è stata tappata, ed è stata applicata una pressione negativa mediante l'uso di una siringa da 20 ml con una ago da 20 G. Il vuoto facilita la fuoriuscita di bolle d'aria allo scopo di impregnare completamente il materiale con lo stroma di midollo osseo. La composizione è stata incubata a temperatura ambiente per 20 minuti prima dell'impianto.

#### *Procedura chirurgica*

I 36 animali sono stati sottoposti ad anestesia, la articolazione del ginocchio è stata esposta tramite incisione effettuata dal bordo mediale della patella al bordo anteriore dell'inserzione distale del legamento collaterale mediale. La parte distale del muscolo quadricipite è stato inciso e i piccoli vasi sono stati cauterizzati prima di incidere la capsula. La patella è stata spostata lateralmente e il ginocchio flesso al massimo. I difetti osteocondrali del diametro di 3 mm e della profondità di 3 mm sono stati effettuati con il trapano al centro del condilo a 1,5 mm sopra il bordo del menisco mediale. L'area è stata ripulita con una curetta e i bordi con il bisturi.

Gli impianti sono stati posti nel difetto e, dopo aver ridotto la patella, la capsula e il muscolo sono stati chiusi con filo da sutura doppio 4-0 dextron e la pelle con un filo da sutura 4-0 dextron.

#### *Processo istologico*

I conigli sono stati sacrificati a 4 e 12 settimane dopo la chirurgia e il condilo è stato fissato in formalina, decalcificato, imbevuto in paraffina, sezionato e colorato con blu di toluidina. Tutti i difetti di 12 settimane sono stati valutati



con la scala di 24 punti di O'Driscoll's modificata si seguito riportata:

-	Percentuale di cartilagine ialina	
	80-100%	8
	60-80%	6
	40-60%	4
	20-40%	2
	0-20%	0
-	Regolarità della superficie	
	Liscia e intatta	3
	Laminazione superficiale orizzontale	2
	Fessure	1
	elevata disgregazione con formazione di fibrille	0
-	Modificazioni degenerative	
	elevata ipercellularità	1
	media o moderata ipercellularità	2
	Cellularità normale, nessun raggruppamento, colorazione normale	3
	Cellularità normale, raggruppamenti medi, colorazione moderata	2
	Ipo cellularità media e moderata, colorazione leggera	1
	Ipo cellularità elevata, colorazione povera o assente	0
-	Integrità strutturale	
	Normale	2
	Leggera disgregazione che include cisti	1
	Elevata disgregazione	0
-	Spessore	
	cartilagine normale 121-150%	1
	cartilagine normale 81-120%	2
	cartilagine normale 51-80%	1
	cartilagine normale 0-50%	0
-	Integrazione a sinistra	
	Legata	2
	Parzialmente legata	1
	Non legata	0



-	Integrazione a destra	
	Legata	2
	Parzialmente legata	1
	Non legata	0
-	Riempimento osseo	
	101-125%	2
	76-100%	3
	51-75%	2
	26-50%	1
	0-25%	0
-	Linea di demarcazione	
	Presente	1
	Assente	0
-	Cambiamenti degenerativi della cartilagine adiacente	
	Cellularità normale, nessun raggruppamento, colorazione normale	3
	Cellularità normale, raggruppamenti medi, colorazione moderata	2
	Ipocellularità media o moderata, colorazione leggera	1
	Ipocellularità elevata, colorazione scarsa o assente	0

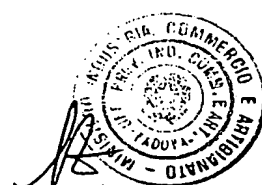


### *Analisi statistica*

I punteggi sia dei difetti trattati sia di quelli non trattati sono stati comparati con il test Mann Whitney della somma dei ranghi. I punteggi relativi ai difetti trattati con ACP e ACP+ stroma di midollo osseo sono stati comparati con il test dei ranghi segnati di Wilcoxon.

### **Risultati**

Il tessuto di riparazione dei difetti non trattati era simile a entrambi i tempi. I difetti mostravano tessuto osseo fino a od oltre la linea di demarcazione tra osso e cartilagine, mentre lo strato superiore non calcificato variava da tessuto fibroso non differenziato a tessuto fibrocartilagineo e tessuto con



caratteristiche più ialino-simile.

La maggior parte dei difetti non trattati mostravano una quantità variabile dei tre tipi di tessuto con campioni di 12 settimane che presentano uno strato superiore più sottile.

I difetti trattati con ACP dopo quattro settimane dalla chirurgia mostravano un rapido riempimento osseo endocondrale fino a livello della linea di demarcazione tra osso e cartilagine ad eccezione che nella parte centrale del difetto dove è stata osservata cartilagine ipertrofica. Lo strato superiore era composto di cartilagine ialino-simile che mostrava una sorprendente integrazione con la cartilagine adiacente. I campioni di 12 settimane esibivano tessuto osseo fino a od oltre la linea di demarcazione tra osso e cartilagine e uno strato non calcificato di cartilagine ialino-simile che aveva uno spessore pari alla metà di quello della cartilagine normale. In tutti i campioni non sono stati osservati residui di materiale.

Dopo 4 settimane dalla chirurgia, i difetti trattati con HYAFF11 mostravano uno strato di cellule condrogeniche distribuiti sulla superficie interfacciale tra il tessuto ospite e il difetto, mentre nel centro del difetto era presente materiale spugnoso senza cellule. Lo strato superiore era variabile, in certi casi con cartilagine ialino-simile in altri con fibrocartilagine. Il tessuto del difetto era sempre integrato con la cartilagine adiacente. A 12 settimane, la maggior parte dei difetti mostrava un riempimento osseo con una parte centrale di tessuto fibroso. In alcuni difetti è stata rilevata la presenza di cartilagine ipertrofica. Lo strato superficiale non mineralizzato era composto principalmente da





cartilagine ialina, in certi casi, con crepe e fessure. Il materiale impiantato era visibile nei campioni di 4 settimane mentre non sono stati osservati residui di materiale a 12 settimane.

I campioni di 4 settimane trattati con ACP + stroma di midollo osseo presentavano le stesse caratteristiche dei difetti trattati con ACP, ad eccezione che per la presenza di una più alta percentuale di cartilagine ialina nello strato superiore del tessuto di rigenerazione. A 12 settimane, l'apparenza globale dei difetti trattati con ACP + stroma di midollo osseo era molto simile a quella dei difetti trattati con ACP, con riempimento osseo al di sopra della linea di demarcazione tra osso e cartilagine ed uno strato di tessuto cartilagineo avente spessore minore a quello della cartilagine adiacente. Tuttavia, lo strato superficiale non calcificato era leggermente più spesso nei difetti trattati con ACP + stroma di midollo osseo, ed esibiva una colorazione distribuita in modo più simile a quello della cartilagine normale.

La integrazione del tessuto rigenerativo con il tessuto circostante era superiore nel gruppo trattato con ACP + stroma di midollo osseo. In tutti i campioni non sono stati osservati residui di materiale.

Il seguente schema mostra i punteggi dei campioni a 12 settimane.

Gruppo	Punteggio	n
Non trattato	$15,5 \pm 3,47$	10
ACP	$20,1 \pm 3,00$	15
HYAFF11	$17,3 \pm 3,33$	8



I punteggi istologici dei campioni non hanno rilevato differenze significative tra i difetti trattati con ACP e quelli trattati con ACP + stroma di midollo osseo a 4 ( $p=0,15$ ) e 12 settimane ( $p=0,06$ ) come riportato nel seguente schema:

Gruppo	4 settimane		12 settimane	
	Score	n	Score	n
ACP	$16,3 \pm 7,12$	6	$19,8 \pm 3,54$	6
ACP + stroma di midollo osseo	$20,17 \pm 5,19$	6	$21,2 \pm 1,60$	6

### Conclusioni

Sebbene sia possibile che l'insieme di cellule differenti (stroma di midollo osseo, sinoviociti, condrociti) contribuisca al processo di riparazione del difetto osteocondrale, le cellule progenitrici mesenchimali del midollo osseo sono probabilmente quelle contribuiscono principalmente al naturale processo riparativo. Il tessuto naturale riparativo nei difetti non trattati non possiede le caratteristiche funzionali della cartilagine articolare normale e nel tempo degenera.

Un materiale poroso biocompatibile e biodegradabile da impiantare nel difetto deve avere una composizione chimica appropriata, permettere la differenziazione delle cellule riparative e rappresentare un buon supporto per



tali cellule che devono rigenerarsi e integrarsi. I derivati dell'acido ialuronico rappresentano un ottimo veicolo per le cellule e posseggono una composizione tale da ricreare un ambiente simile a quello embrionale che favorisce il processo rigenerativo.

La struttura porosa costituita da ACP, inoltre, presenta le proprietà di riassorbimento che si adattano sorprendentemente con la dinamica dei processi riparativi. Mediante questo studio è stato provato che il biomateriale poroso costituito da ACP per se permette una rigenerazione osteocondrale paragonabile a quella che si ottiene con lo stesso biomateriale caricato con stroma di midollo osseo.

#### Esempio 4

*Valutazione della rigenerazione ossea indotta dagli esteri benzilici parziali dell'acido ialuronico aventi percentuale di esterificazione del 75% (HYAFF11p75) rispetto a quella indotta dagli esteri benzilici totali (HYAFF11)*

Scopo dello studio è di valutare la rigenerazione ossea in difetti ossei creati nella calvaria di coniglio a seguito dell'impianto di biomateriali costituiti da derivati dell'acido ialuronico.

Sono stati utilizzati conigli maschi New Zealand e di 8 mesi e del peso di circa 3 Kg. Sono stati creati 2 difetti sulla calvaria di ciascun animale che sono stati trattati secondo il seguente schema:



Stella, 10/10/1971  
Via De' Canonici, 10/10/1971  
Porta 10/10/1971

Gruppo	N° di siti di trattamento	TRATTAMENTO	DOSE	Periodo di trattamento in giorni	Via	
1	6	HYAFF11 non-tessuto	~ 0.15 gr.	7	Topica	
2	6	HYAFF11p75 non tessuto				
3	6	HYAFF11 Polvere				
4	6	HYAFF11p75 Polvere				
1	6	HYAFF11 non-tessuto		10		
2	6	HYAFF11p75 non-tessuto				
3	6	HYAFF 11 Polvere				
4	6	HYAFF11p75 Polvere				
1	6	HYAFF11 non-tessuto		21		
2	6	HYAFF11p75 non-tessuto				
3	6	HYAFF11 Polvere				
4	6	HYAFF11p75 Polvere				

Ogni animale è stato anestetizzato con una iniezione di 4 ml i.m. di una soluzione di ketamina/Xylazina ottenuta miscelando 5 ml di Xylazina 20 mg/ml e 10 ml di ketamina 50 mg/ml. Successivamente è stata eseguita una anestesia locale mediante iniezioni sulla periferia della zona d'intervento e sono stati creati i difetti ossei sulla calvaria, uno posteriore ed uno anteriore rispetto all'area mediano-saggittale. I difetti erano di forma circolare con un diametro di 8 mm ed una profondità di 2-3 mm.

Dopo l'intervento ogni animale è stato trattato con antibiotici e analgesici.

Il grado di riparazione ossea è stato valutato in 3 diversi periodi di tempo dopo l'intervento: 10, 21 e 40 giorni. Allo scadere di questi tempi si è proceduto ad



eutanasia degli animali mediante atmosfera di anidride carbonica e al prelievo dell'area della calvaria interessata.

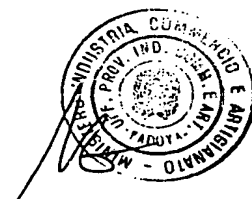
Dopo il prelievo i tessuti sono stati fissati e decalcificati (trattamento per 2 giorni circa) con una soluzione composta da acido picrico, formalina ed acido formico, successivamente sono stati inclusi in paraffina e sezionati. Le sezioni, 3 per ogni campione, sono state colorate con Ematossilina-Eosina, Tricromica di Mallory e Blu di Toluidina o Alcian Blu a pH 2,5.

Le sezioni istologiche colorate sono state analizzate al microscopio per le valutazioni istomorfometriche, eseguite utilizzando un sistema morfometrico computerizzato (IBAS), basate sulla rigenerazione tissutale data dalle evidenze durante le tappe successive della riparazione espresse come percentuale rispetto alle dimensioni iniziali del difetto.

I risultati riportati nel grafico 3 mostrano che il biomateriale costituito da derivati esteri dell'acido ialuronico aventi una percentuale di esterificazione tra 60 e 85 (NW p75) inducono una percentuale di rigenerazione ossea maggiore rispetto i derivati esterei aventi una percentuale maggiore di esterificazione (85-100%) (NW 11) e lavorati nella stessa forma.

\*\*\* \*\*


Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:



### RIVENDICAZIONI

- 1) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili comprendenti almeno un derivato dell'acido ialuronico processato in forma di struttura tridimensionale contenente spazi vuoti formati da pori comunicanti e/o fibre fini o microfibre intrecciate tra loro, eventualmente in associazione con sostanze farmaceuticamente o biologicamente attive e/o con polimeri naturali, sintetici o semisintetici, per la rigenerazione dei tessuti umani.
- 2) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono gli esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica.
- 3) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono gli esteri autoreticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici sono esterificate con le funzioni alcoliche della stessa catena polisaccaridica o di altre catene.
- 4) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono i composti reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici sono esterificati con polialcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, generando delle reticolazioni mediante catene spaziatrici.



5114 - 4/10/1974 - 10/10/1974  
Via del Corso, 100 - 00187 Roma  
Partita IVA 0123456789  


- 5) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono gli emiesteri dell'acido succinico o sali di metalli pesanti dell'emiestere dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri parziali o totali dell'acido ialuronico.
- 6) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono i derivati solfatati o N-solfatati.
- 7) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo le rivendicazioni 1-2, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono esteri parziali dell'acido ialuronico aventi una percentuale di esterificazione inferiore all'85% e, preferibilmente, tra 40 e 85%.
- 8) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo le rivendicazioni 1-2, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono esteri parziali dell'acido ialuronico aventi una percentuale di esterificazione tra 60 e 85%.
- 9) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo le rivendicazioni 7-8, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono esteri benzilici parziali dell'acido ialuronico.
- 10) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui le sostanze farmaceuticamente attive sono agenti antiinfiammatori, antibiotici, fattori di crescita.
- 11) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in forma di tessuto non-tessuto, corde, composizioni liofile.
- 12) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i polimeri naturali sono scelti dal gruppo consistente in collagene,



- coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali la chitina, il chitosano, la pectina o l'acido pectico, l'agar, l'agarosio, lo xantano, il gellano, l'acido alginico o gli alginati, polimannani o poliglicani, amido, gomme naturali.
- 13) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i polimeri semisintetici sono scelti dal gruppo consistente in collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, dei glicosamminoglicani.
- 14) Biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo la rivendicazione 1, in cui i polimeri sintetici sono scelti dal gruppo consistente in acido polilattico, acido poliglicolico o copolimeri degli stessi o dei loro derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani, PTFE.
- 15) Uso dei biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo le rivendicazioni 1-14, nella chirurgia umana e veterinaria.
- 16) Uso dei biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo le rivendicazioni 1-14, in chirurgia plastica ed estetica, in ortopedia, in odontoiatria, nella chirurgia nervosa e cardiovascolare.
- 17) Uso dei biomateriali biodegradali secondo le rivendicazioni 1-14, per la

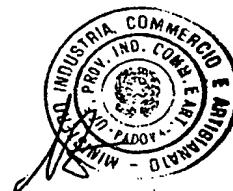




rigenerazione dei tessuti dermici, ossei, cartilaginei, nervosi, cardiovascolari, adiposi, epatici.

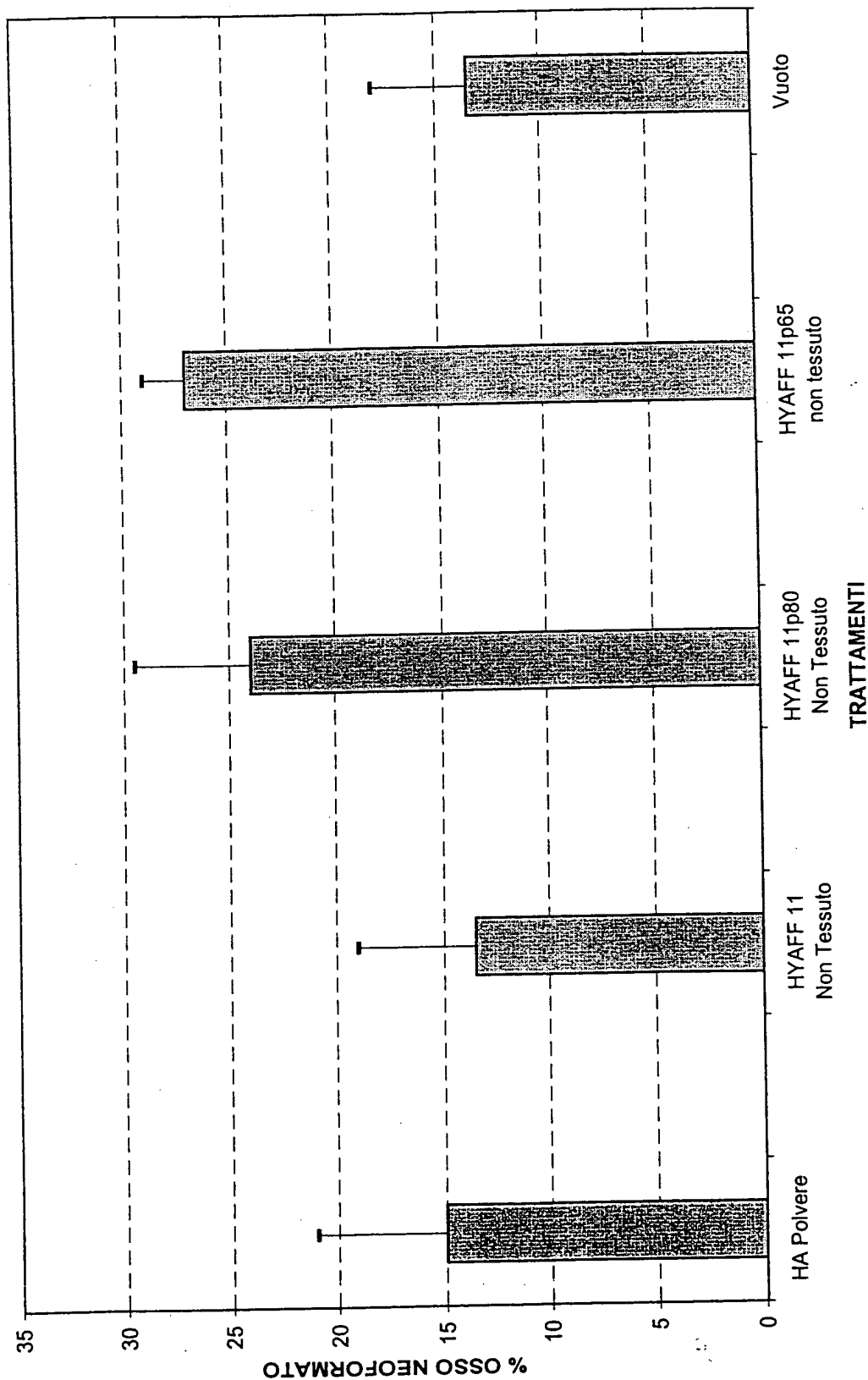
- 18) Uso dei biomateriali biocompatibili e biodegradabili secondo le rivendicazioni 1-14, come riempimento o sostituito dei tessuti soffici.

FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.p.A.  
IL PRESIDENTE  
Dott. Luciano Tolusso



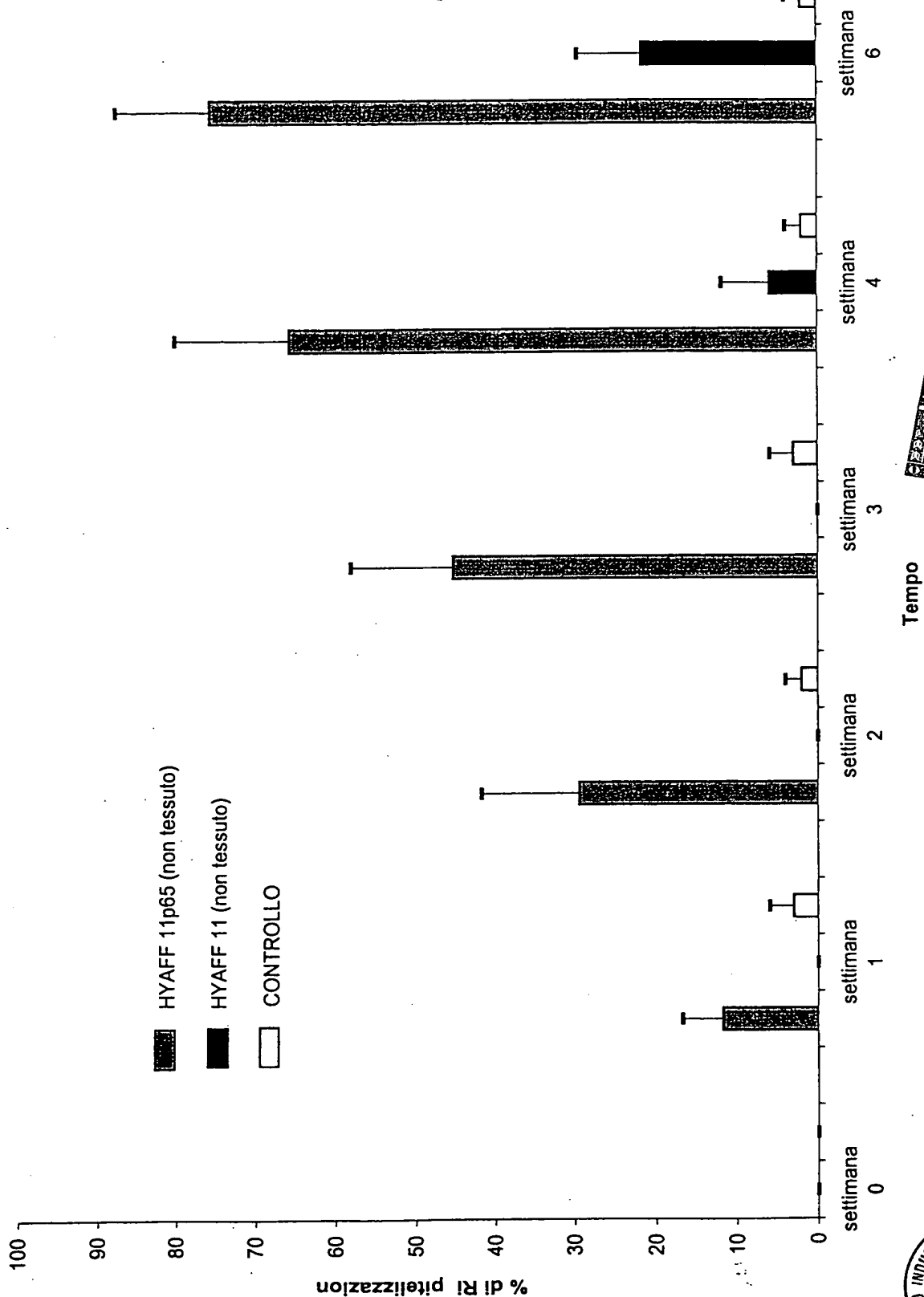
PD 98 A 0 0 0 2 9 9

OSSO NEOFORMATO A 24 GIORNI



PROV. ...  
Via Del ...  
Partita IVA ...

PD 98 A 0 0 0 2 9 9

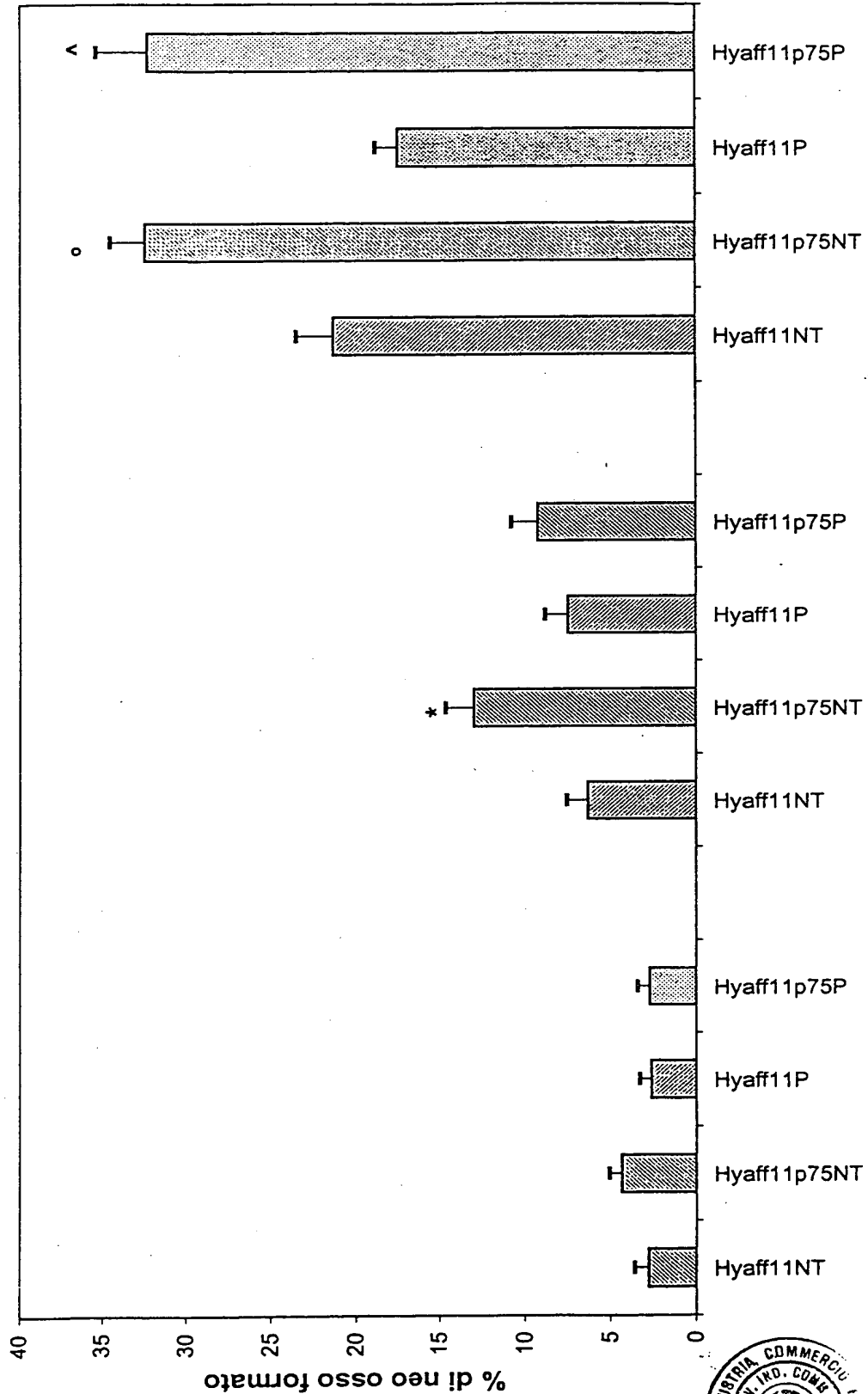


Tempo



PD 98 A 0 0 0 2 9 9

% di rigenerazione ossea dopo una lesione di 8 mm di diametro indotta su teca  
cranica di coniglio osservata a 7-10 ed a 21 giorni



\*=P<0.05 HYAFF11p75 NT vs HYAFF11 NT  
°=P<0.05 HYAFF11p75 NT vs HYAFF11 NT, HYAFF11 P  
^=P<0.05 HYAFF11p75 NT vs HYAFF11 NT, HYAFF11 P

NT = non tessuto  
P = polvere

